

食品機能学によるプレニルフラボノイドの特性解明



徳島大学大学院生物資源産業学研究部 向井理恵

はじめに

$C_6-C_3-C_6$ の diphenylpropane 構造を共通骨格とするフラボノイドは植物が生産する二次代謝物であり、重要な食品機能成分として注目されている。プレニルフラボノイドは、diphenylpropane に 1 つ以上の C5 isoprene (dimethylallyl) unit(s) が結合した構造を有する一連の化合物群である。主にマメ科やクワ科の植物に含まれ（図1）、約 1000 種類の構造が同定されている。プレニルフラボノイドは、非プレニル型よりも培養細胞や微生物を用いた評価系において高い生理活性を持つことが報告してきた。植物においてフラボノイドへのプレニル基転移酵素が同定され、遺伝子操作作物においてこれらプレニルフラボノイドを生産する研究も進んでいる。これらの背景から、プレニルフラボノイドは食品機能成分の有力な候補物質であると考えた。食品機能成分の生体での機能発現は吸収や代謝を介するため動物個体を用いた研究が必須であるが、プレニルフラボノイドに関しては標品を入手し難いことから研究例がなかった。そこで、候補者は共同研究者によって化学合成された各種プレニルフラボノイドを用いて^{1,2)}、非プレニル型のフラボノイドと比較することで、食品機能成分としてのプレニルフラボノイドの特性を下記のとおり明らかにした。

1. プレニルフラボノイドの新規生理活性の発見

—廃用性筋萎縮の予防・改善へ向けて—

骨格筋量は健康寿命の重要な決定因子であり、運動不足や寝たきりに伴う廃用性筋萎縮への対応策が求められている。骨格筋タンパク質分解の経路のひとつにユビキチン・プロテアーソーム経路の関与が示されている。この経路では、IGF-1/mTOR/Akt のリン酸化カスケードが抑制され、筋タンパク質分解に特異的に関与するユビキチンリガーゼ (Atrogin-1 など) が発現することが知られている。ナリンゲニンの 8 位にプレニル基が結合した 8-プレニルナリンゲニンを廃用性筋萎縮モデルマウスに摂取させた場合、Akt のリン酸化を活性化することで Atrogin-1 の発現を抑制し、骨格筋量低下予防に繋がることを明らかにした（図2）。非プレニル型のナリンゲニンでは効果が認められなかったことから、プレニル基の優位性が明らかとなっ

た³⁾。

さらなる骨格筋機能への影響を確認するため、廃用性筋萎縮からの回復促進効果について検討を進めた⁴⁾。ギプス固定を模した関節固定器具を開発し、マウスの後肢に装着することで廃用性筋萎縮を誘導した。間接固定を解除すると骨格筋量の回復が開始される。回復期間に 8-プレニルナリンゲニンの経口摂取を実施すると、筋量回復がコントロール食よりも促進されることが明らかとなった。卵巣切除メスマウスを用いて同様の実験を実施したところ、8-プレニルナリンゲニン摂取あるいはエストロゲンの投与のいずれにおいても筋萎縮からの回復を促進した。さらに C2C12 マウス骨格筋管細胞を用いた検討では、エストロゲン受容体阻害剤によって 8-プレニルナリンゲニンの Akt リン酸化活性作用が消失した（図2）。これらの実験事実から、8-プレニルナリンゲニンのエストロゲン様活性が骨格筋合成促進効果に寄与していることが示唆された。

8-プレニルナリンゲニンの組織蓄積性に関する情報を得たため標的組織である骨格筋での蓄積量を HPLC で分析した。8-プレニルナリンゲニンの蓄積量 (3.0 nmol/g tissue) は、ナリンゲニン (0.2 nmol/g tissue) に比較して約 10 倍高いことが認められた³⁾。また、8-プレニルナリンゲニンの血中濃度を測定した結果では、ナリンゲニンよりも血中からの消失が遅いことが分かった。これらの事実は、プレニル基修飾が生体利用性を向上させ、骨格筋組織での蓄積を増加させる鍵となる構造変換であることを示すものであった。このように、プレニルフラボノイドの強い生理活性の要因のひとつに高い組織蓄積性が関与することが示唆された。

2. プレニルフラボノイドの標的臓器と生体利用性

—高い臓器蓄積性—

経口で摂取したフラボノイドの活性発現は、吸収、代謝、臓器分布の状況によって変化する。しかしながら、これらの生体利用性に関する研究報告は、フラボノイドの生理活性の報告に比べて著しく少ない。このような現状を踏まえ、プレニルフラ

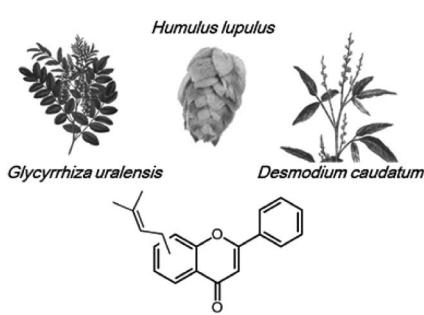


図1. プレニルフラボノイドを含む食用植物

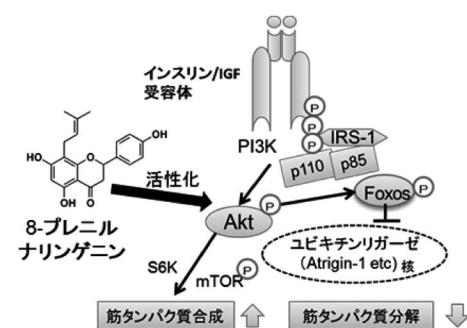


図2. 8-プレニルナリンゲニンは Akt 経路のリン酸化を活性化することで、筋タンパク質分解抑制効果と合成促進効果を示した。

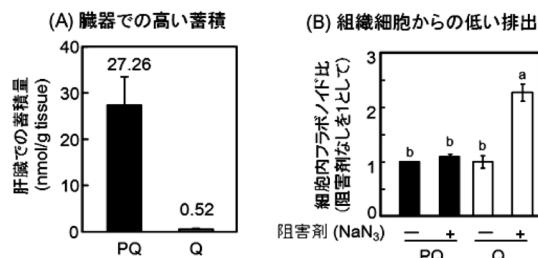


図3. (A) 8-プレニルケルセチン (PQ) 摂取後の肝臓での蓄積量はケルセチン (Q) より多い。(B) フラボノイド排出阻害剤を処理しても PQ 量が変化しなかったため、細胞外への排出は起こっていない。(文献5改変)

ボノイドの応用開発に向けてプレニル基を有するフラボノイドと非プレニル型のフラボノイドを比較することにより、プレニル基修飾がフラボノイドの体内動態に及ぼす影響の解明を試みた⁵⁾。試験には体内動態に関する知見が多いケルセチンを母骨格とする8-プレニルケルセチンを用いた。マウスに8-プレニルケルセチンを混餌により2週間摂取させた場合、肝臓や腎臓における蓄積量はケルセチンの場合よりも10倍以上多いことが示された(図3)。一方で、生体吸収性の指標である単回摂取後の血中とリンパ液中の濃度を測定した結果では、8-プレニルケルセチンで低く、小腸上皮モデルCaco-2細胞を用いた腸管透過実験でも8-プレニルケルセチンの基底膜側への移行量が極めて少ないことを発見した。このように8-プレニルケルセチンは吸収されにくいものの、一部の臓器で高い蓄積性を示すという矛盾した結果が示された。この矛盾を解明するために、臓器モデルとしてマウス骨格筋由来C2C12細胞への取り込み実験を行った。その結果、8-プレニルケルセチンの細胞内取り込み量はケルセチンよりも10倍程度多くなり、長い時間維持された。さらに8-プレニルケルセチンはケルセチンとは異なり、ABCトランスポーターを介した細胞外への排出をほぼ受けなかった(図3)。これらの実験事実から、プレニルフラボノイドは臓器構成細胞への取り込み率が高くかつ細胞から排出されにくくことで、低い吸収性を補い臓器内での蓄積が上昇すると結論した。フラボノイドの組織蓄積性を向上させる技術は未だ開発されていないことから、フラボノイドへのプレニル基付加が高生理活性発現に向けた新たな技術になることが期待される。

3. プレニルフラボノイドの標的分子に関する研究

8-プレニルケルセチンや8-プレニルナリンゲニンの吸収代謝に関する研究により、プレニル基はフラボノイドの母骨格に結合した状態で循環し、臓器へ到達することを明らかにした。つまり、プレニルフラボノイドは生体内においてもプレニル基に由来する物理化学的特徴を保持しており、標的分子との相互作用が非プレニル型とは異なることが推察された。細胞膜を構成する脂質二重膜を模したリポソームとの結合実験では、8-プレニルケルセチンの膜結合性がケルセチンよりも強いことを明らかにした。8-プレニルケルセチンのオクタノール/水分配係数の算出により、プレニル基の結合がケルセチンの疎水性を高めたことを確認した。この性質によって、脂質二重膜との結合性が上昇したことを明らかにした⁵⁾。

LPS誘導性炎症に対する8-プレニルケルセチンの効果を評価した研究において、セファロースを用いたプルダウンアッセイにより、8-プレニルケルセチンは細胞質に存在するプロテイン

キナーゼ (SEK-1, JNK1/2, MEK1, ERK1/2) にケルセチンよりも強く作用した。その結果、これらのキナーゼが関わるリン酸化を減弱させ、抗炎症作用を発揮することを示した⁶⁾。

以上、いずれの研究においてもプレニルフラボノイドの標的分子への作用は非プレニル型フラボノイドよりも強いことを示し、フラボノイドへのプレニル基修飾は高活性をもたらす構造変換であることを明らかにした。

おわりに

現在は、化学合成品や市販品を用いて解析対象とするプレニルフラボノイドの種類を増やし、詳細な構造活性相関の研究に取り組んでいる。プレニル基の結合位置やフラボノイドの母骨格の構造による活性の相違を解明しつつある。これらの知見を集約することで、より活性の高いプレニルフラボノイドを提示し、応用開発につなげたいと考えている。

(引用文献)

- T. Kawamura, M. Hayashi, R. Mukai, J. Terao and H. Nemoto. An efficient method for c8-prenylation of flavonols and flavanones. *Synthesis*, Vol.44, 9, p1308–1314, (2012).
- T. Kawamura, M. Hayashi, R. Mukai, J. Terao and H. Nemoto. The first synthesis of uralenol, 5'-prenylated quercetin, via palladium-catalyzed O-dimethylallylation reaction with concurrent acetyl migration. *Synthesis*, Vol.46, 2, p170–174, (2014).
- R. Mukai, H. Horikawa, Y. Fujikura, T. Kawamura, H. Nemoto, T. Nikawa and J. Terao. Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylharingenin in denervated mice. *PLoS ONE*, Vol.7, 9, e45048, (2012).
- R. Mukai, H. Horikawa, P.Y. Lin, N. Tsukumo, T. Nikawa, T. Kawamura, H. Nemoto and J. Terao. 8-Prenylharingenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation pathway in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol.311, 6, R1022–R1031, (2016).
- R. Mukai, Y. Fujikura, K. Murota, M. Uehara, S. Minekawa, N. Matsui, T. Kawamura, H. Nemoto and J. Terao. Prenylation enhances quercetin uptake and reduces efflux in Caco-2 cells and enhances tissue accumulation in mice fed long-term. *J Nutr*, Vol.143, 10, p1558–1564, (2013).
- A. Hisanaga, R. Mukai, K. Sakao, J. Terao and D.X. Hou. Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of 8-prenyl quercetin. *Mol Nutr Food Res*, Vol.60, 5, p1020–1032, (2016).

謝 辞 本研究は、主に徳島大学大学院医歯薬学研究部・食品機能学分野ならびに徳島大学大学院生物資源産業学研究部において実施されたものです。両研究部において本研究を支えてくださいました先生方、スタッフの皆様ならびに卒業生の皆様に感謝いたします。特に徳島大学名誉教授(現甲南女子大学)・寺尾純二先生には本研究課題のきっかけを与えていただき、多くのご指導と励ましをいただきましたことを深謝いたします。徳島大学医歯薬学研究部教授・二川健先生、同研究部准教授・根本尚夫先生、鹿児島大学農学部教授・侯徳興先生との共同研究によって本課題が推進されましたことにお礼申し上げます。そして学生時代から長くご指導いただき、暖かく見守ってくださった神戸大学大学院農学研究科教授・芦田均先生、食品の機能性研究の面白さを全身で教えてくださった首都大学東京名誉教授・東直樹先生に感謝いたします。